

図1 ヘム合成経路とHCPの代謝障害

表1 ポルフィリン症の分類, 特徴的な生化学的所見および主要症状

ポルフィリン症		主要症状			生化学的所見		
分類	病型	皮膚	神経	肝	尿	血液	糞便
赤芽球性	皮膚型						
	CEP	+++	-	+	UP I > CP I	CP, ZP	CP
	EPP	+~+++	-	+	肝障害により CP I	FP	PP
	HEP	+++	-	+	UP III > 7P, CP	FP, CP	PP, isoCP
	PCT	+~++++	-	+	UP III > 7P	正常	isoCP, CP > PP
肝性	急性						
	VP	+~+++	++	+	ALA, PBG, CP III > UP III	正常	PP > CP, X-P
	HCP	-~+++	++	+	ALA, PBG, CP III	正常	CP > PP
	AIP	-	++	+	ALA, PBG	正常	正常

各病型により出現するポルフィリンの総量およびポルフィリン・パターンが異なる。AIPでは寛解期でも尿中ALA, PBGの増量をみる。生化学的所見でのポルフィリン代謝関連物質は特徴的な増量所見を示す。主要症状として、EPPを除いた全病型において赤色尿がみられる。

7P: heptacarboxyl porphyrin, X-P: X-porphyrin peptide, PP: protoporphyrin, FP: free-PP, ZP: zinc-PP, CP: coproporphyrin, UP: uroporphyrin, VP: 多様性ポルフィリン症, HCP: 遺伝性コプロポルフィリン症, AIP: 急性間欠性ポルフィリン症。

表2 遺伝性コプロポルフィリン症の遺伝子異常の一部

遺伝子異常	タンパクの変異
C85→T ^{a)}	Glu29→ter
G265→A	Gly89→Ser
G301→A	Glu101→Lys
C445→T	Pro149→Ser
526番目のTが欠失 ^{b)}	フレームシフト
G538→A ^{b)}	Gly180→Arg
G545→A	Gly189→Ser
C691→T	Arg231→Trp
C883→G	His295→Asp
A910→G	Lys304→Glu
968番目の塩基にT挿入	フレームシフト
G977→A (エクソン6のスキップ)	スプライシング異常
C991→T ^{a)}	Arg331→Trp
A1210→C ^{a)}	Lys404→Glu

^{a)}ホモ接合体, ^{b)}日本人家系で見いだされた変異。

して1983年にNordmannら¹²⁾によって発見された。本症はCPO遺伝子のダブルヘテロ接合体として発症する。

4. 病 態

表3に主な臨床所見を示した。HCPはAIP類似の急性症状を主とするが、それよりは軽症のことが多い。皮膚症状を伴うことがあり、この点ではVPに類似し鑑別が必要となる。急性症状・皮膚症状ともVPと同じと考えられている。

5. 診断と鑑別診断

急性ポルフィリン症の診断には臨床症状からポルフィリン症を疑って血液、糞便および尿中のポルフィリンおよび尿中ポルフィリン前駆体(ALA, PBG)の検査を行うのが一般的である。急性ポルフィリン症では、尿中のALA, 特にPBGの増量を確認することである。ただし、AIPでは寛解期にも尿中のALA, PBGの増加が持続するが、HCPおよびVPでは正常化する。また、VPとの鑑別は、糞便中のポルフィリンを測定しPPとともにCPが著明に増加していることを確認すればよい。また、HCPの糞便中

表3 HCPでみられる症候と誤診されやすい疾患

主な症状・所見	誤診されやすい疾患
腹痛	急性腹症
嘔吐	てんかん
便秘(または下痢)	イレウス
発汗, 不安, 不眠	急性膀胱炎, 消化器潰瘍
末梢運動麻痺	虫垂炎
四肢知覚障害	妊娠悪阻
意識障害	肝障害
痙攣, てんかん発作	胆石
脳神経麻痺	日光皮膚炎
筋萎縮	その他
幻覚, 妄想, ヒステリー	
高血圧, 頰脈	
暗褐色(赤色)尿	
肝障害	
電解質代謝異常	
その他	

表については他の急性ポルフィリン症(急性間欠性ポルフィリン症, 多様性ポルフィリン症)においてもみられる。

CPは寛解期でも持続的に高値を示す⁹⁾。不顕性遺伝子保有者の診断には遺伝子診断が最も確実であるのはいうまでもない。

急性ポルフィリン症では腹痛、嘔吐などの消化器症状、痙攣、末梢神経障害、うつ症などの精神神経症状および高血圧などが急性～亜急性(1～数日)に生じてくるため、往々にして本症と気づかれずに誤診されることも多く、特に急性腹症には注意を要する。早期には、急性腹症、てんかんと誤診されやすく(表3)、鑑別に注意すべきであるという点はAIPの場合と同じである。

6. 治療と予後

急性ポルフィリン症では早期診断が極めて重要であり、対応を誤らなければ一般に予後は良好である。治療上は各病型に特異的なものではなく、急性ポルフィリン症として一括して論じられることが多い。治療についてはいまだに十分なものはなく、対症療法しかない¹³⁾。大量のブドウ糖の投与を行うとともに、疼痛、有痛性の

しびれ, 不眠などにはクロロプロマジン, 高血圧, 頻脈などにはプロプラノロールなどを, 痙攣にはジアゼパム, 抱水クロラールなど安全とされる薬剤¹⁴⁾を選んで投与する. この際注意しなければならないことは, 薬剤によっては同じ薬剤が報告によっては安全とされたり, 危険と報告されたりしている点である. ヘマチンや

ヘムアルギニンの静脈内投与が臨床症状のみならずポルフィリン代謝異常の改善にも有効と報告され, 原因療法に近い治療法として期待されている¹⁵⁾. 予防法としては, 遺伝歴の明らかかな人は, 誘発要因となる薬剤の使用を避けることが何よりも重要である.

II

赤血球の異常

■ 文 献

- 1) Anderson KE, et al: Disorders of heme biosynthesis X-linked sideroblastic anemia and the porphyrias. In: The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease (ed by Scriver CR, et al), 8th ed, p2991-3062, McGraw-Hill, New York, 2001.
- 2) Sassa S: Modern diagnosis and management of the porphyria. Br J Haematol 135: 281-292, 2006.
- 3) Kappas A, et al: The Porphyria. In: The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease (ed by Scriver CR, et al), p2103-2159, McGraw-Hill, New York, 1995.
- 4) 近藤雅雄ほか: 遺伝性ポルフィリン症の生化学診断法及び診断基準案の作成. ALA-Porphyrin Science 1: 33-43, 2012.
- 5) 佐々木英夫ほか: 急性ポルフィリン症. 現代化学増刊 27(ポルフィリン・ヘムの生命科学, ポルフィリン研究会編), p145-153, 東京化学同人, 1995.
- 6) 佐々木英夫ほか: 肝性コプロポルフィリン症, Hepatic Coproporphyrin(遺伝性コプロポルフィリン症, Hereditary Coproporphyrin)の9例—ポルフィリン症の新しい病型. 最新医学 25: 1978-1995, 1970.
- 7) 近藤雅雄, 網中雅仁: 遺伝性ポルフィリン症第1例報告(1920)から91年間(2010年)の累積. 厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)平成23年度総括・分担研究報告書, p24-30, 2012.
- 8) 矢野雄三ほか: ポルフィリン症の疫学. 現代化学増刊 27(ポルフィリン・ヘムの生命科学, ポルフィリン研究会編), p136-144, 東京化学同人, 1995.
- 9) 工藤吉郎: 尿ポルフィリンのスクリーニング法—ポルフィリン症発見のために—. 日本臨牀 53(6): 1503-1506, 1995.
- 10) Lamolil J, et al: A molecular defect in coproporphyrinogen oxidase gene causing harderoporphyria a variant form of hereditary coproporphyrin. Hum Mol Genet 4: 275-278, 1995.
- 11) 近藤雅雄ほか: 骨髄異形成症候群に合併したハルデロポルフィリン症が疑われた特発性ポルフィリン症. Porphyrins 5(4): 363-374, 1996.
- 12) Nordmann Y, et al: Harderoporphyria: a variant hereditary coproporphyrin. J Clin Invest 72: 1139-1149, 1983.
- 13) Kondo M, et al: Porphyrins in Japan: compilation of all cases reported through 2002. Int J Hematol 79: 448-456, 2004.
- 14) 近藤雅雄ほか: ポルフィリン症と薬剤. Porphyrins 8(2): 87-96, 1999.
- 15) Mustajoki P, Nordmann Y: Early administration of heme arginate for acute porphyric attacks. Arch Intern Med 153: 2004-2008, 1993.

II 赤血球の異常

ポルフィリン代謝異常 後天性ポルフィリン代謝異常

鉛中毒によるポルフィリン症

Porphyrinurea in lead poisoning

Key words: 鉛中毒, 後天性ポルフィリン代謝異常, ポルフィリン尿症,
δ-アミノレブリン酸脱水酵素, 化学的ポルフィリン症

網中雅仁¹
高田礼子¹
近藤雅雄²

1. 概念・定義

先天性ポルフィリン症とは別に、環境要因が後天的にポルフィリン代謝へ影響を与える場合がある。環境要因には化学物質や農薬、医薬品、食品、水、大気などが挙げられ(表1-I¹⁾、健常者でも過剰にクロレラやあわびの肝を摂取した場合に含有するフェオフォルバイドによってポルフィリン症様日光過敏症を起こすことが知られている。一方、前述の化学的ポルフィリン症のほかにも作用機序は明らかではないが、原疾患に合併して尿中ポルフィリン濃度が増加する現象をポルフィリン尿症と呼んでいる。ポルフィリン尿症は二次性であり、原疾患の治療によって消失する。ポルフィリン尿症を起こす疾患を表1-II²⁾に示す。

環境要因を原因とした後天性ポルフィリン代謝異常(表1-I)の場合、複合曝露の影響も懸念されるが、特に鉛中毒はポルフィリン代謝に直接影響を与え、貧血や痙攣、神経症状など急性ポルフィリン症と類似の中毒症状をきたす。しかし、鉛中毒は急性ポルフィリン症と治療法が異なることから両者の鑑別診断が重要となる。

2. 疫学

1) 発症事例

労働衛生現場では無機鉛によるバッテリー、電子基板、ゴム・塩化ビニル製造、クリスタルガラス製造、圧電素子などに使われており、これらの製造作業中での中毒事例がある。アルキ

ル鉛はかつて有鉛ガソリン添加剤として使用されたが、現在は使用されていない。一方、生活環境では古い鉛含有塗料や土産物の漢方薬、個人輸入の健康食品、アーユルヴェーダなどの伝統医療に使われる薬品に含まれていた事例³⁾がある。米国では子ども用ブレスレットを原因とした鉛中毒によって小児が死亡し、中国製ブレスレットやネックレスから鉛が検出された。この事例を受けて日本も調査を実施し³⁾、国内でも小児の鉛中毒が懸念される状況にある。

2) 鉛曝露とポルフィリン代謝異常との関連性

鉛曝露がポルフィリン代謝に直接的な影響を与えることは既知の事象であり、鉛の生物学的曝露指標として血液中鉛量(Pb-B)や尿中δ-アミノレブリン酸(ALA)、赤血球中プロトポルフィリン量(PP)、赤血球中ALA脱水酵素(ALAD)活性などの変化が用いられている。鉛曝露者のPb-B, PP, ALAD, 尿中鉛量(Pb-U), ALAを4段階のPb-Bに分けて表2に示した。ALADは他の生物学的曝露指標に比較して鋭敏なため、低濃度曝露の評価には有効だが、Pb-Bが40 μ g/dLを超える場合は指標にならず、労働衛生現場での鉛健診には用いられていない。山村⁴⁾によればPb-Bの増加に伴い、ALADは指数曲線的に低下して50 μ g/dLで閾値を示し、Pb-Bが40-50 μ g/dLから赤血液中zinc protoporphyrin(ZPP), ALA, CPの急激な増加を報告している。なお、日本人健常者では、Pb-B 1.4 \pm 0.8 μ g/dL, PP 95.4 \pm 19.6 μ g/RBC, 尿中uro-

¹Masahito Aminaka, Ayako Takata: Preventive Medicine, St. Marianna University School of Medicine 聖マリアンナ医科大学 予防医学教室 ²Masao Kondo: Faculty of Human Life Sciences, Tokyo City University 東京都立大学人間科学部

表1 ポルフィリン代謝異常を起こす化学物質および疾患

I. 化学的ポルフィリン症(化学物質曝露)
鉛, 水銀, ヒ素, 銅, 鉄, 錫, 亜鉛, タリウムなど 多ハロゲン化芳香族化合物, アリル基含有化合物, グリセオフルビン, フェノバルビタール, セドルミッド, カルバマゼピン, フェンスキシミド, DDC, ビル, アルコール, スチレン, トリクロロエチレンなど
II. 二次性ポルフィリン尿症
1. 先天性代謝異常症 遺伝性チロシン血症, Dubin-Johnson 症候群, Rotor 症候群など
2. 肝胆道疾患 閉塞性黄疸, 胆汁うっ滞症, アルコール性肝障害, 原発性胆汁性肝硬変, 肝炎, 肝硬変, 肝細胞癌, 薬物性肝障害, ヘモクロマトーシスなど
3. 血液疾患 溶血性貧血, 鉄欠乏性貧血, 鉄芽球形貧血, 悪性貧血, 白血病など
4. 代謝疾患 糖尿病, 甲状腺機能亢進症など
5. ビタミン欠乏症 ナイアシン, ビタミンB ₆ , B ₁₂ 欠乏など

赤血球の異常

表2 鉛曝露者の血液中鉛量とポルフィリン関連物質の濃度

	n	Pb-B	PP	ALAD	Pb-U	ALA
$\mu\text{g/dL}$		$\mu\text{g/dL}$	$\mu\text{g/L}$	$\mu\text{g/RBC}$	$\mu\text{mol PBG mL RBC/h}$	mg/L
Pb-B<10	7	6.7±3.02	84.7±12.35	0.98±0.19	4.97±2.41	1.54±0.56
10≤Pb-B<20	8	16.3±2.41	95.1±37.50	0.84±0.40	39.53±34.52	2.79±1.10
20≤Pb-B<40	9	25.4±3.55	128.0±102.8	0.36±0.19	69.06±22.91	3.17±2.27
40≤Pb-B	6	47.7±6.36	194.7±72.11	0.20±0.11	108.27±57.95	3.40±1.67
total	30	23.3±15.02	123.4±78.35	0.59±0.40	54.57±49.83	2.73±1.70

Pb-B: 血液中鉛量, PP: 赤血球中プロトポルフィリン量, ALAD: δ -アミノレブリン酸脱水酵素活性, Pb-U: 尿中鉛量, ALA: 尿中 δ -アミノレブリン酸量.

porphyrin(UP)12.5±5.08 $\mu\text{g/g cr.}$, 尿中 coproporphyrin I(CP I)18.6±11.5 $\mu\text{g/g cr.}$, 尿中 coproporphyrin III(CP III)26.2±23.8 $\mu\text{g/g cr.}$ であったことが報告されている^{5,6)}.

3. 病因・病態

1) 発症要因

労働衛生現場では金属鉛のヒューム, 無機鉛化合物の粉じんを経気道や経口から曝露する。また, 酢酸鉛やオレイン酸鉛などの水溶性鉛は経皮からも, アルキル鉛などの有機鉛化合物では蒸気として経気道や経皮からも曝露する。経口摂取による体内吸収は経気道や経皮に比較して低く, 消化管から体外に排出される。体内吸収された鉛は, 尿や糞便, 汗などから体外へと

排出される。アルキル鉛では肝臓, 腎臓, 脳, 心臓に蓄積され, 代謝されないものは肺から排出される。

慢性曝露では体内吸収された鉛の多くが赤血球中のタンパクと結合している。残りが血漿鉛として血流を介して全身に運ばれ, 骨髄や腎臓, 中枢神経系に影響を与える。体内では臓器に比較して90%以上が骨髄に蓄積され, 骨髄での生物学的半減期は10年程度とされる。急性中毒におけるPb-Bの半減期は数週~数カ月程度である。また, 血液中と骨髄中の生物学的半減期は18.7日および21年との報告もある⁷⁾。

2) 鉛の作用機序

骨髄は鉛の標的臓器であり, 貧血症状を呈する前に造血系細胞やポルフィリン代謝の異常が

出現する。骨髓像では赤芽球の過形成を認め、赤芽球には好塩基斑点が出現し、核の形態異常、後天性鉄芽球性貧血などのヘモグロビン合成障害が生じる。また、鉛による中枢神経系への作用機序の一つにprotein kinase Cと鉛イオンの拮抗作用が挙げられており、神経伝達物質が働く際の細胞応答への影響が考えられている⁹⁾。

鉛曝露では胃、腎臓、呼吸器、膀胱での発がん性の可能性があり(IARC group 2A)、生体内に蓄積したALAの代謝過程で生じるオキシバレン酸の活性酸素生成による影響が懸念されている⁹⁾。

3) 鉛によるポルフィリン代謝異常の機序

体内吸収された鉛は赤血球中ALADを直接的に阻害する。赤血球内でのポルフィリン代謝はほとんど行われないため、赤血球中ALADは、骨髓での影響を反映している。鉛はALADに存在するSH基に結合した亜鉛と拮抗作用を起こして失活する。ALADの阻害によってポルフィリン代謝が滞るため、前駆物質のALAが蓄積する。また、骨髓でのPPへのFe²⁺の供給やFe³⁺のミトコンドリアへの移行が抑制されるため、フェロキターゼ(FeC)が働かず、前駆物質のPPが蓄積する。更にCPの増加を認めるが、これは健常者のCP IIIがCP Iの1.4倍前後であるのに対してPb-Bが30 μ g/dL前後の場合、約4.5倍程度に増加するためである⁹⁾。一方、CPが増加する作用機序は、明らかではない。

4) 鉛による貧血発現の機序

鉛曝露による貧血の発症機序は、ヘム合成障害によるヘモグロビン量の低下、溶血性貧血による赤血球寿命の短縮によるものとされている。

5) 鉛の耐容摂取量と個人差

鉛の1日摂取量が3-4 μ g/kg body weightの曝露であればPb-Bが増加するレベルではない⁹⁾。CDCは小児の鉛曝露と健康影響に関する知見からPb-Bを10 μ g/dL未満としているが、その後の疫学研究によって10 μ g/dL未満であっても知能指数(IQ)の低下が明らかになったため¹⁰⁾、WHOは小児および妊婦の曝露を可能なかぎり低くすることを勧告している。また、鉛はALADを直接的に阻害するが、ALAD遺伝

子にはALAD1とALAD2の遺伝子多型があり、ALAD1をホモに有する場合、ALAD2を有する場合と比較して鉛曝露によるポルフィリン代謝への感受性が高いことが知られている¹¹⁾。

6) 臨床症状

鉛中毒では日光過敏による皮膚症状を認めない。慢性や亜急性中毒では、無痛性の伸筋麻痺、視力障害、握力減退、手指の振戦、筋肉痛、関節痛、貧血を生じ、高濃度の場合は鉛蒼白、鉛縁がみられる。Pb-Bが20 μ g/dL前後ではポルフィリン代謝異常としてALAD低下が始まりPPが上昇、40 μ g/dL以上からALAやCP、特にCP IIIの急激な上昇を認める。Pb-Bが80 μ g/dL以上では造血系障害として鉛貧血、好塩基性斑点赤血球、鉄芽球が出現する。急性中毒では興奮や不安、食欲不振、頭痛、意識障害を認め、150 μ g/dL以上で疝痛(小腸の痙攣性収縮による激しい痛み)や嘔吐が認められる。

鉛曝露において小児は成人に比較して体内吸収率が高く、神経系細胞への感受性も高く、また脳血液関門(BBB)が未熟であるため、鉛脳症を発症しやすい。神経代謝病との混同に注意が必要である¹²⁾。まれに成人の鉛脳症も報告されている¹³⁾。

4. 診断と鑑別診断

上記の臨床症状に加え、問診によって鉛に曝露するような職歴や生活環境にいるかを見つけ出すことが重要である。鉛中毒の診断では、Pb-B、Pb-Uの測定を行う。これは、鉛曝露による健康影響と生物学的曝露指標の間に量-影響(反応)関係の証明が必要で、Pb-Bなどが他の指標に比較して適しているためである。鉛中毒ではALAやCPの増加、神経症状などから急性ポルフィリン症(遺伝性コプロポルフィリン症、急性間欠性ポルフィリン症など)が疑われる。しかし、鉛中毒では尿中ポルフォビリノゲン(PBG)は上昇せず、PPの増加も認められないため、急性ポルフィリン症との鑑別が可能である。赤芽球性プロトポルフィリン症では遊離プロトポルフィリン(FEP)の上昇と日光過敏症を認めるが、鉛中毒ではZPPが上昇し、日光過

敏症もないため、鑑別が可能である。また、鉄欠乏性貧血ではMCVの低下およびALAやZPPの増加を認める一方、ALADに変化はないが、鉛中毒ではMCVの上昇とALADの低下から鑑別が可能である。他の疾病による溶血性貧血や鉄芽球性貧血との鑑別にはPb-BやALADなど鉛中毒を考慮した検査が必要となる。

5. 治療と予後

経口摂取の急性中毒では胃洗浄や硫酸マグネシウムの投与、体内吸収が相当量の場合はキレート剤(メソ-2,3-ジメリカプトコハク酸, CaNa₂EDTA, BAL)を投与する。キレート療法

は中毒症状を認め、かつPb-Bが70 μ g/dL以上の成人や脳障害を呈する場合、またはPb-Bが45 μ g/dL以上の小児に対して適用する。キレート剤は肝および腎機能障害の患者には禁忌である¹⁴⁾。また、ペニシラミンの経口投与も有効である。その他の治療としては対処療法を行う。Pb-Bが10 μ g/dL程度を超える場合、特に小児の場合には注意深く経過観察し、鉛曝露の低減方法など予防措置を講じる必要がある。貧血や痙攣では治療によって軽快する症例が多く、肋間神経麻痺や脳症では予後が悪く、死亡や重篤な後遺症を認める症例が多い。

II

赤血球の異常

文献

- 1) 近藤雅雄, 矢野雄三: 鉛中毒によるポルフィリン症. 別冊日本臨牀 血液症候群(I), p487-489, 日本臨牀社, 1998.
- 2) Gupta N, et al: Lead poisoning associated with Ayurvedic drug presenting as intestinal obstruction: a case report. Clin Chim Acta 412: 213-214, 2010.
- 3) 内山巖雄, 東 賢一: 環境中の鉛による健康影響について. モダンメディア 55: 91-98, 2009.
- 4) 山村行夫: 主な毒性物質による神経障害 無機鉛と有機鉛. Clin Neuroscience 7: 1082-1084, 1989.
- 5) 荒井二三夫ほか: 健常者158名における血液中鉛(Pb)濃度について. 産業衛誌 46: 380, 2004.
- 6) 網中雅仁ほか: 日本人健常者の尿中ポルフィリン濃度に関する研究. 臨環境医 11: 29-35, 2002.
- 7) 後藤 稠ほか(編): 産業中毒便覧増補版, 医歯薬出版, 1981.
- 8) 川西正祐, 及川伸二: 遺伝子損傷性の金属 3-c代謝異常を起こす重金属 鉛(lead). 分子予防環境医学, p644-645, 本の泉社, 2010.
- 9) International program on chemical safety. In: Inorganic Lead, Environ Health Criteria, p165, World Health Organization, 1995.
- 10) Surkan PJ, et al: Neuropsychological function in children with blood lead levels<10 μ g/dL. Neurotoxicology 28: 1170-1177, 2007.
- 11) Kelada SN, et al: Delta-aminolevulinic acid dehydratase genotype and lead toxicity: a HuGE review. Am J Epidemiol 154: 1-13, 2001.
- 12) Sahu JK, et al: Lead encephalopathy in an infant mimicking a neurometabolic disorder. J Child Neurol 25: 390-392, 2010.
- 13) Rolston DD: Uncommon sources and some unusual manifestations of lead poisoning in a tropical developing country. Trop Med Health 39: 127-132, 2011.
- 14) Beers MH, Berkow R(編), 福島雅典(日本語版総監修): 第21節 外傷・中毒, メルクマニユアル 第18版(日本語版), p2838-2840, 日経BP社, 2006.

δ-アミノレブリン酸

近藤雅雄 東京都市大学人間科学部

基準値

尿： 2 mg/l 以下
血清(血漿)：3.7~24.8 μg/l

測定法

尿、血清中のδ-アミノレブリン酸(ALA)の測定法は高速液体クロマトグラフィーが主流である。

何を知らるための検査か

ALAはヘム生合成経路の最初の代謝物、すなわち、ポルフィリン前駆物質であり、急性ポルフィリン症の診断や予後判定、鉛曝露指標として重要である。

異常値を示す場合

高値：急性ポルフィリン症(急性間欠性ポルフィリン症(AIP)、遺伝性コプロポルフィリン症(HCP)の急性期、多様性ポルフィリン症(VP)の急性期、δ-アミノレブリン酸脱水酵素(ALAD)欠損性ポルフィリン症(ADP))、遺伝性チロシン血症、鉛中毒で著明に増量する。その他、鉄欠乏性貧血、再生不良性貧血、溶血性貧血などで軽度上昇するが、臨床的意義は低い。低値を示す疾患はとくに確立されていない。

異常値を示すメカニズム

ポルフィリン-ヘム生合成経路の特徴によって、障害酵素の基質が尿中に多量出現する。しかし、同時にポルフィリン代謝系全体のバランスも崩れるため、多数のポルフィリン類が出現する。したがって、ALAが異常高値を示す疾患では病型によって尿中に出現するポルフィリンの種類と量が異なるため、鑑別診断にはポルフィリン類の測定が必要である。

ALAが増量する原因として、①ADPを除いた急性ポルフィリン症などのようなヘム濃度減少に基づく肝ALA合成酵素活性上昇(負のフィードバック機構)による増量、②ADPや鉛中毒のようなALAD酵素自体の障害に基づく活性低下

による増量がある。

検査のピットフォール

急性ポルフィリン症や鉛中毒などでは赤色尿をみることが多く、遠紫外線照射により赤色蛍光がみられるのでスクリーニングに有用である。

尿中ALAは急性ポルフィリン症のキャリアでもとどき著明な増量を認めるが、骨髄(赤芽球)性ポルフィリン症では増量しない。

どう検査を進めるか

尿中ポルフィリン代謝関連物質の検査および臨床症状(①激しい腹痛、嘔吐、便秘や多彩な神経症状、②皮膚露出部に水疱、瘢痕、色素沈着、皮膚の脆弱性)によってポルフィリン代謝異常症の判定はつくが、さらに関連酵素活性の測定および遺伝子診断を行えば確実である。鉛中毒が疑われる場合は血清鉛やALADなど鉛予防規則に併せて検討する。

異常値とその対策

原因不明の腹痛、嘔吐、便秘あるいは下痢などの消化器症状や多彩な神経症状がある場合には急性ポルフィリン症や鉛中毒を疑い、尿中ALAを測定することが重要である。これらの疾患は放置すると重篤な神経症状をきたす。

急性ポルフィリン症の場合、誘発因子(薬物、飲酒、喫煙、ストレス、無理なダイエット、排卵誘発剤など)があればただちに取り除く。光線過敏性皮膚症状があれば遮光する。その他、各病状に応じた対症療法を行う。家族歴の聴取を行い不顕性遺伝子保有者の早期診断を行う。

文献

- 1) 近藤雅雄：最新臨床検査項目辞典，医歯薬出版，東京，p289-299，2008
- 2) 近藤雅雄ほか：別冊日本臨牀，新領域別症候群シリーズ No.22 先天代謝異常症候群(第2版)下，日本臨牀社，大阪，p167-219，2012
- 3) 森田陽子ほか：産業医学 35：112-118，1993
- 4) 田島 裕：日臨 67(増8)：776-779，2009

ポルフィリン(コプロポルフィリン, プロトポルフィリン, ポルホビリノーゲン)

近藤雅雄 東京都市大学人間科学部

基準値

CP: 100 $\mu\text{g/day}$ 以下(HPLC)
 PP: 30~86 $\mu\text{g/dl}$ RBC(HPLC)
 PBG: 2 mg/day 以下(比色法)

測定法

ポルフィリンの測定には目的のポルフィリンを溶媒抽出した後に蛍光分光光度計にて計る蛍光法と、試料中の全ポルフィリンを分画定量する高速液体クロマトグラフィー(HPLC)がある。ポルフィリンの前駆物質であるポルホビリノーゲン(PBG)は比色法が一般的である。

何を知らるための検査か

ポルフィリンはヘム生合成経路の中間体あるいは中間体由来の酸化物であり、健常者では主にウロポルフィリン(UP), コプロポルフィリン(CP), プロトポルフィリンIX(PP)の3種類が検出されるが、遺伝性ポルフィリン症などのポルフィリン代謝異常症では多数のポルフィリンが大量に尿中排泄されるため、確定診断には必須な検査である。

異常値を示す場合

高値: 先天性赤芽球性ポルフィリン症(CEP), 遺伝性コプロポルフィリン症(HCP), 多様性ポルフィリン症(VP), 急性間欠性ポルフィリン症(AIP), 晩発性皮膚ポルフィリン症(PCT), 赤芽球性プロトポルフィリン症(EPP), 肝赤芽球性ポルフィリン症(HEP), 鉛中毒, 各種肝障害, 多ハロゲン芳香族化合物中毒などの診断に重要である。このうち, CPはHCPと鉛中毒, PPはEPP, PBGは急性ポルフィリン症(AIP, HCP, VP)の診断に重要である。また, これらポルフィリン代謝異常症の病態機序解明に必要である。

低値: 低値を示す疾患はない。Dubin-Johnson症候群ではCPのⅢ型異性体が正常値よりも低値を示すが, CPのⅠ型異性体が増量するため総CP量は正常範囲内にある。

異常値を示すメカニズム

ポルフィリン・ヘム生合成系の特徴によって、遺伝子または酵素障害が存在する部位の基質が尿中にもっとも多く出現する。しかし、同時にポルフィリン代謝系全体のバランスも崩れるため、多数のポルフィリンが出現する。したがって、異常高値を示す疾患では病型によって尿中に出現するポルフィリンの種類と量が異なるため、特定のポルフィリンのみを測定するだけでなく、他のポルフィリン類の測定も必要である。

検査のピットフォール

ポルフィリン代謝異常症ではEPPを除いて赤色尿をみることが多く、遠紫外線照射により赤色蛍光がみられるのでスクリーニングに有用である。

サンプル採取・保存: 24時間尿では、畜尿中に変化する場合が多いため、随時尿を遮光・凍結保存するのが望ましい。

測定上の問題: 排尿直後および血漿中のポルフィリンはほとんどが還元型のポルフィリンノーゲンであり、無色で赤色蛍光はない。蛍光測定する場合は必ず完全に酸化してから測定しないと測定値がばらつく。

測定値の問題: CPは肝障害や精神障害および薬物投与などによって高値を示す場合がある(ポルフィリン尿症)。ポルフィリン症や鉛中毒では基準値上限の5倍以上の増量が認められる。鑑別診断にはHPLCによる分画分析を行うのが望ましい。赤血球PPには赤血球遊離PP(FEP)と亜鉛結合PP(ZP)の2種類が含まれており、鉄欠乏性貧血症、鉛中毒ではZPが、EPP、鉄芽球性貧血症、溶血性貧血症ではFEPが増量するため、注意が必要である。

どう検査を進めるか

血液および尿中ポルフィリン代謝関連物質の検査および臨床症状(①皮膚露出部に水疱, 瘢痕, 色素沈着, 皮膚の脆弱性, ②激しい腹痛, 嘔吐, 便秘や多彩な神経症状, あるいは③肝障害と光

線過敏症の合併など)によってポルフィリン代謝異常症の判定はつづが、さらに関連酵素活性の測定および遺伝子診断を行えば確実である。鉛中毒が疑われる場合は尿中δ-アミノレブリン酸(ALA)や赤血球 ALA 脱水酵素活性の測定を行う。

異常値とその対策

誘発因子があればただちにこれを取り除く。急性ポルフィリン症では禁忌薬物に注意する。光線過敏性皮膚症状では遮光する。その他、各病状に応じた対症療法を行う。家族歴の聴取を行い不顕

性遺伝子保有者の早期診断を行う。

文献

- 1) 近藤雅雄：最新臨床検査項目辞典，医歯薬出版，東京，p289-299，2008
- 2) 近藤雅雄ほか：別冊日本臨牀，新領域症候群シリーズ No.22 先天代謝異常症候群(第2版)下，日本臨牀社，大阪，p167-219，2012
- 3) 近藤雅雄ほか：ALA-Porphyrin Science 1：73-82，2012
- 4) 近藤雅雄：内科学書，改訂第7版，Vol.5，中山書店，東京，p399-405，2009

南江堂

概説と検査解説を臨床に即した分類で構成した隔年改訂の好評書



今日の臨床検査 2013-2014

監修 櫻林郁之介

検査解説では検査の目的、方法、保険点数、判読のポイントなどをわかりやすく解説。2013-2014年版では、検査解説に「検査値に影響を与える薬剤・食物・サプリメント」、付録に薬物副作用基準を示した「CTCAE v4.0」を新たに追加。索引をより充実し使いやすさアップ!

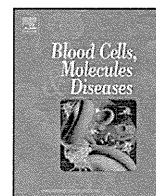
主要目次

臨床検査 最近の動向	10. 輸血・血液型検査	20. 膵・消化管機能検査	32. 性腺・胎盤検査
主要病態の検査	11. HLA 検査	21. 動脈血ガス分析と酸塩基平衡	33. 膵・消化管ホルモン検査
検査解説	12. 糖代謝検査	22. 炎症マーカー検査	34. 各種生理活性物質検査
1. 尿検査	13. 脂質代謝検査	23. アレルギー検査	35. 腫瘍マーカー検査
2. 便検査	14. 電解質、ビタミン、 無機質代謝検査	24. 自己免疫疾患関連検査	36. 薬物検査 (TDM)
3. 喀痰検査	15. 骨代謝関連検査	25. 細胞性免疫検査	37. 毒物濃度
4. 末梢血球検査	16. 肝・胆道機能検査	26. 感染症検査	38. 穿刺液検査
5. 骨髓検査	17. 腎機能検査	27. 下垂体および下垂体機能検査	
6. 造血器腫瘍関連検査	18. 酵素検査	28. 甲状腺機能検査	
7. 遺伝子検査	19. 血清蛋白、その他の 生化学検査	29. 副甲状腺機能検査	
8. 染色体検査		30. 副腎皮質検査	
9. 血栓・止血検査		31. 副腎髄質検査	

2013

B6判・678頁 2013.4. 定価 5,040円 (本体+税5%) ISBN978-4-524-26822-1 internal medicine

血清蛋白、その他の生化学検査



Letter to the Editor

A novel G168X mutation and a recurrent 730-731delCT mutation of the porphobilinogen deaminase gene in Japanese patients with acute intermittent porphyria

To the Editor;

Acute intermittent porphyria (AIP), an autosomal dominant disease, is caused by a deficiency of the third enzyme in heme biosynthesis, porphobilinogen deaminase (PBGD) [1]. Patients with this disease present with a neurological syndrome which may take the form of autonomic or peripheral axonal neuropathy or central nervous system dysfunction. The symptoms are generally manifested intermittently with rapid onset, and can be induced by drugs, alcohol, starvation, infection, endocrine factors or excessive stress [1]. However, most carriers of the defective gene are clinically latent. Therefore, early detection of carriers of the defective gene is important to prevent the attack, since carriers can be advised to avoid the precipitating factors. Determination of the gene abnormality has been successfully made in many cases, and, to date, more than 300 mutations in the PBGD gene have been characterized (<http://www.hgmd.cf.ac.uk>). Recently, we established the diagnosis of AIP for two Japanese patients from separate families, and identified two pathogenic mutations in the PBGD gene.

We studied patient 1, 28 years old and patient 2, 22 years old who were Japanese women with AIP. The diagnosis of the patients was established on the basis of clinical symptoms of the disease, and increased excretion of δ -aminolevulinic acid (ALA) (43.0 and 39.4 mg/day, respectively) and PBG (83.0 and 94.8 mg/day, respectively) in urine. Except for the patients, no other individual from their families has ever shown clinical symptoms corresponding to AIP. Genomic DNAs were extracted from peripheral blood leukocytes and all coding regions and splice sites of the PBGD gene were amplified by polymerase chain reaction (PCR) as previously described [2]. PCR products were directly sequenced using the BigDye deoxy terminator V3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA) according to the manufacturer's instructions.

Direct sequencing of the amplified DNA fragments from patient 1 showed a c. G502T mutation in exon 10 of the gene resulting in a G168X in the protein. For patient 2, sequencing of exon 12 revealed a two base deletion of CT at nucleotide 730–731 (c. 730-731delCT), which caused a frameshift resulting in premature termination at residue 250. No other genetic abnormality was found in the gene of both patients. The two mutations cause defective protein production, and, thus, they are exactly pathogenic mutations for patients 1 and 2, respectively. A G168X mutation was not reported previously, but a c. 730-731delCT mutation has been reported independently worldwide, such as in Sweden, Finland, Denmark, Holland, France, England, Italy, Argentina, Israel and also Japan [3–6].

To investigate the possibility of the common remote ancestral origins for c. 730-731delCT mutations in Japan, we constructed haplotypes using the following seven intragenic single nucleotide polymorphisms

(SNPs): rs589925 T>C (5'-UTR); rs1006195 G>T (intron 2); rs17075 G>A (intron 3); rs549893 T>C (intron 4); rs494048 T>C (intron 9); rs1784304 A>C (intron 10); and rs640603 G>A (3'-NTR) and we analyzed two AIP patients who carry the c. 730-731delCT mutation, one was our patient 2 and the other was the patient previously reported [6]. Intragenic haplotypes of the mutated allele taken from them were segregated with two different SNP haplotypes, defined as T-G-G-C-T-A-A and C-T-A-T-C-C-A, respectively.

The majority of mutations in the PBGD gene are specific for individuals or a few families. But several recurrent mutations have been reported to date. These recurrent mutations are categorized as either of ancestral founder origins or derivatives from mutational hot-spot regions [7]. The c. 730-731delCT mutation reflects a microdeletion that occurred within the following PBGD cDNA sequence of GAGACTCTGCTTCGC. This mutation site is imbedded in a 5 bp nucleotide motif, YYYTG, which recently has been recognized to be non-coincidentally associated with microdeletions [8]. Such a mutational hot-spot could explain why the mutation c. 730-731delCT arose independently in several AIP cohorts from different countries. Furthermore, haplotype analysis indicates that c. 730-731delCT mutations of Japanese families seem to be derived from de novo mutations.

Acknowledgments

This work was supported by Health and Labor Science Research Grants (H24-nanchi-180) from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan.

References

- [1] A. Kappas, S. Sassa, R.A. Galbraith, Y. Nordmann, The porphyrias, in: J.B. Stanbury, J.B. Wyngaarden, D.S. Fredrickson, et al., (Eds.), *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, 6th ed., McGraw-Hill, New York, 1989, pp. 1305–1365.
- [2] J. Sakabe, S. Sasa, M. Daimon, M.Y. Lan, T. Kato, A novel 12-base pair deletion mutation in exon 15 of the porphobilinogen deaminase gene in a Taiwanese patient with acute intermittent porphyria, *Blood Cells Mol. Dis.* 41 (2) (2008) 202.
- [3] F. Martinez di Montemuros, E. Di Pierro, G. Biolcati, E. Rocchi, E. Bissolotti, D. Tavazzi, G. Fiorelli, M.D. Cappellini, Acute intermittent porphyria: heterogeneity of mutations in the hydroxymethylbilane synthase gene in Italy, *Blood Cells Mol. Dis.* 27 (6) (2001) 961–970.
- [4] A. De Siervi, M.V. Rossetti, V.E. Parera, K.H. Astrin, G.I. Aizencang, I.A. Glass, A.M. Batlle, R.J. Desnick, Identification and characterization of hydroxymethylbilane synthase mutations causing acute intermittent porphyria: evidence for an ancestral founder of the common G111R mutation, *Am. J. Med. Genet.* 86 (4) (1999) 366–375.
- [5] D. Ulbrichova, X. Schneider-Yin, R. Mamet, V. Saudek, P. Martasek, E.I. Minder, N. Schoenfeld, Correlation between biochemical findings, structural and enzymatic abnormalities in mutated HMBS identified in six Israeli families with acute intermittent porphyria, *Blood Cells Mol. Dis.* 42 (2) (2009) 167–173.
- [6] N. Maeda, Y. Horie, K. Adachi, E. Nanba, H. Kawasaki, M. Daimon, Y. Kudo, M. Kondo, Two deletion mutations in the hydroxymethylbilane synthase gene in two unrelated Japanese patients with acute intermittent porphyria, *J. Hum. Genet.* 45 (4) (2000) 263–268.
- [7] X. Schneider-Yin, M. Hergersberg, M.M. Schuurmans, A. Gregor, E.I. Minder, Mutation hotspots in the human porphobilinogen deaminase gene: recurrent mutations G111R and R173Q occurring at CpG motifs, *J. Inher. Metab. Dis.* 27 (5) (2004) 625–631.
- [8] A.S. Kondrashov, I.B. Rogozin, Context of deletions and insertions in human coding sequences, *Hum. Mutat.* 23 (2) (2004) 177–185.

Shinji Susa
Department of Neurology, Hematology, Metabolism,
Endocrinology and Diabetology,
Yamagata University School of Medicine, 2-2-2 Iida-Nishi,
Yamagata 990-9585, Japan
Corresponding author. Fax: +81 23 628 5318.
E-mail address: susa@med.id.yamagata-u.ac.jp.

Makoto Daimon
Department of Neurology, Hematology, Metabolism,
Endocrinology and Diabetology,
Yamagata University School of Medicine, 2-2-2 Iida-Nishi,
Yamagata 990-9585, Japan

Takeo Kato
Department of Neurology, Hematology, Metabolism,
Endocrinology and Diabetology,
Yamagata University School of Medicine, 2-2-2 Iida-Nishi,
Yamagata 990-9585, Japan

Naoto Maeda
Second Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Tottori
University, Yonago 683-8503, Japan

13 February 2013

ORIGINAL ARTICLE

Three school-age cases of xeroderma pigmentosum variant type

Ryusuke Ono¹, Taro Masaki¹, Seiji Takeuchi¹, Ayako Shimizu², Miki Tanioka^{1,3}, Naotomo Kambe², Hiroyuki Matsue², Ryoichi Kamide⁴ & Chikako Nishigori¹

¹Division of Dermatology, Department of Internal Related, Kobe University Graduate School of Medicine, Kobe, Japan.

²Dermatology, Chiba University Hospital Department of Dermatology, Chiba University Graduate School of Medicine, Chiba, Japan.

³Department of Dermatology, Kyoto University Graduate School of Medicine, Kyoto, Japan.

⁴Department of Dermatology, Daisan Hospital, The Jikei University School of Medicine, Tokyo, Japan.

Key words:

children; freckle-like pigmentation; genetic diagnosis; UV; XP-V

Correspondence:

Chikako Nishigori, M.D., Division of Dermatology, Department of Internal Related, Kobe University Graduate School of Medicine, 7-5-1, Kusunoki-Cho, Chuo-ku, Kobe 650-0017, Japan.
Tel: +81-(0)78-382-6130
Fax: +81 (0)78 382-6149
e-mail: chikako@med.kobe-u.ac.jp

Accepted for publication:

24 February 2013

Conflicts of interest:

None declared.

Funding support:

Health and Labour Sciences Research Grants, Research on Intractable Diseases

SUMMARY

Background

Xeroderma pigmentosum (XP) is a photosensitive genodermatosis with increased susceptibility to skin cancers. Patients are typically diagnosed with XP when they consult a dermatologist for skin cancers.

Case/Methods

The genetic analysis and 2–8 years of follow-up for three school-age patients with XP-V is described. The patients were referred to us because of increased pigmented freckles; they had not experienced abnormal sunburn or developed skin cancer at their first visit. All patients harbored a genetic mutation in the *POLH* gene. XPV9KO was diagnosed at age 13 with a homozygous del1661A that creates a stop codon in the non-catalytic domain of *POLH*. The patient practiced sun protection, effectively preventing the development of skin cancer by age 21. XPV19KO was diagnosed at age 11 with a compound heterozygous mutation of G490T and C1066T, causing *POLH* truncation in the catalytic domain. This patient developed basal cell carcinoma at ages 12 and 13. XPV18KO was referred to us at age 11 and diagnosed with compound heterozygous variants of c.1246_1311del66 (exon 9 skipping), a novel mutation, and c.661_764 del104 (exon 6 skipping).

Conclusion

Freckle-like pigmentation on sun-exposed skin is sometimes the only sign of XP-V, and early diagnosis is extremely important for children.

Photodermatol Photoimmunol Photomed 2013; 29: 132–139

Xeroderma pigmentosum (XP) is an autosomal recessive disorder associated with increased susceptibility to freckle-like pigmentation and skin cancers on sun-exposed regions of skin. XP is classified into seven nucleotide excision repair-deficient types (A through G) and an XP variant type (XP-V, MIM: 278750) (1, 2). XP occurs at a higher frequency in Japan (1 in 22 000) (3) than in Europe (2). Approximately 25% of Japanese XP patients are diagnosed with XP-V (4), which is characterized by late onset of skin cancers.

We previously reported the usefulness of combined immunoprecipitation (IP) and sequencing of the *POLH* gene for genetic diagnosis (5). Most patients with XP-V do not experience acute exaggerate sunburn upon minimal sun exposure (5). They typically continue to expose their skin to the sun and are unaware of potential consequences until they consult a dermatologist because of the development of skin cancer. In the present study, we report three school-age cases of XP-V and the 2–9 year follow-up. All three patients were referred to us because of an increase in pigmented freckles; they had not developed skin cancers at the time of their first visit. Early diagnosis of XP is extremely important for children with an increased number of pigmented freckles who perform outdoor activities.

Patient 1 (XPV18KO)

An 11-year-old Japanese boy was referred to Kobe University Hospital because his parents were worried about an increase in the number of pigmented freckles (Fig. 1a). His parents first noticed this increase at the age of 4 and consulted a family doctor. They were told that the freckling was within the range of normal variation. In elementary school, the patient became a member of the soccer club and often played soccer outdoors. The number of pigmented freckles increased gradually, and when the boy was 10 years of age, his mother consulted a dermatologist. The patient did not have photophobia but was suspected of having XP-V and was advised to avoid exposure to sunlight. He presented with pigmented freckles on his face, anterior neck, nuchal region and upper back. However, skin cancers were not detected. Mental retardation and neurodevelopmental disabilities were not present. His parents were not consanguineous, and both were free of symptoms. Over the course of 5 years, his pigmented freckles became prominent (Fig. 1b, c).

Patient 2 (XPV19KO)

An 11-year-old girl was referred to Chiba University Hospital because of numerous pigmented freckles on her face,

which began to increase in number at 2 years of age. She had no photophobia, and her skin was never protected from sunlight. She was referred to us with the diagnosis of possible XP. Physical examination revealed suntanned skin with light-brown to dark-brown pigmented freckles of miliary size on the face, dorsa of hands, forearms, nuchal region, upper back, thighs and lower legs (Fig. 1d, e, f). Freckles were not observed on the submental triangle (Fig. 1e) or on the sun-shielded skin of the buttocks and axillae. Loss of hearing or neurological abnormalities was not observed. Her birth and development were normal. After she entered elementary school, she became a member of the swimming club. Her parents were not consanguineous, and her elder sibling did not display similar clinical features. Her parents were both asymptomatic. Skin cancers were not detected at her first visit to the hospital. However, 1 year and 2 years (Fig. 1g) after the diagnosis, the patient developed basal cell carcinomas (BCCs), which were excised.

Patient 3 (XPV9KO)

In our previous XP-V study, patient XPV9KO presented without any detailed clinical features (5). We briefly summarize her clinical features here, including a 9-year follow-up period. This 13-year-old girl was referred to us because of an increased number of freckles. Her mother noticed the increase in pigmented freckles when she was 4–6 years old. She had been spending the summer seasons without UV protection because she had never experienced sunburn or photophobia. She did not develop skin cancer. At her first visit, she presented with light-brown to dark-brown pigmented freckles of miliary size to pea size on the face, ear, anterior neck, forearms and the dorsa of the hands (Fig. 1h, i). Freckles were not observed on the submental triangle or dorsa of the feet. Her growth was normal for her age, and no neurological abnormalities were detected. Although she was not protected from the sun during the first year after diagnosis, at age 14, she became conscious of her disease and began to practice strict sun protection. The number of pigmented freckles increased only slightly and she had not developed any skin cancers by age 21 (Fig. 1j, k).

MATERIALS AND METHODS

Measurement of minimum erythema dose (MED)

The skin of the patients' backs was irradiated with graded doses of UVB using Toshiba FL20S-E-30 (Toshiba Electric

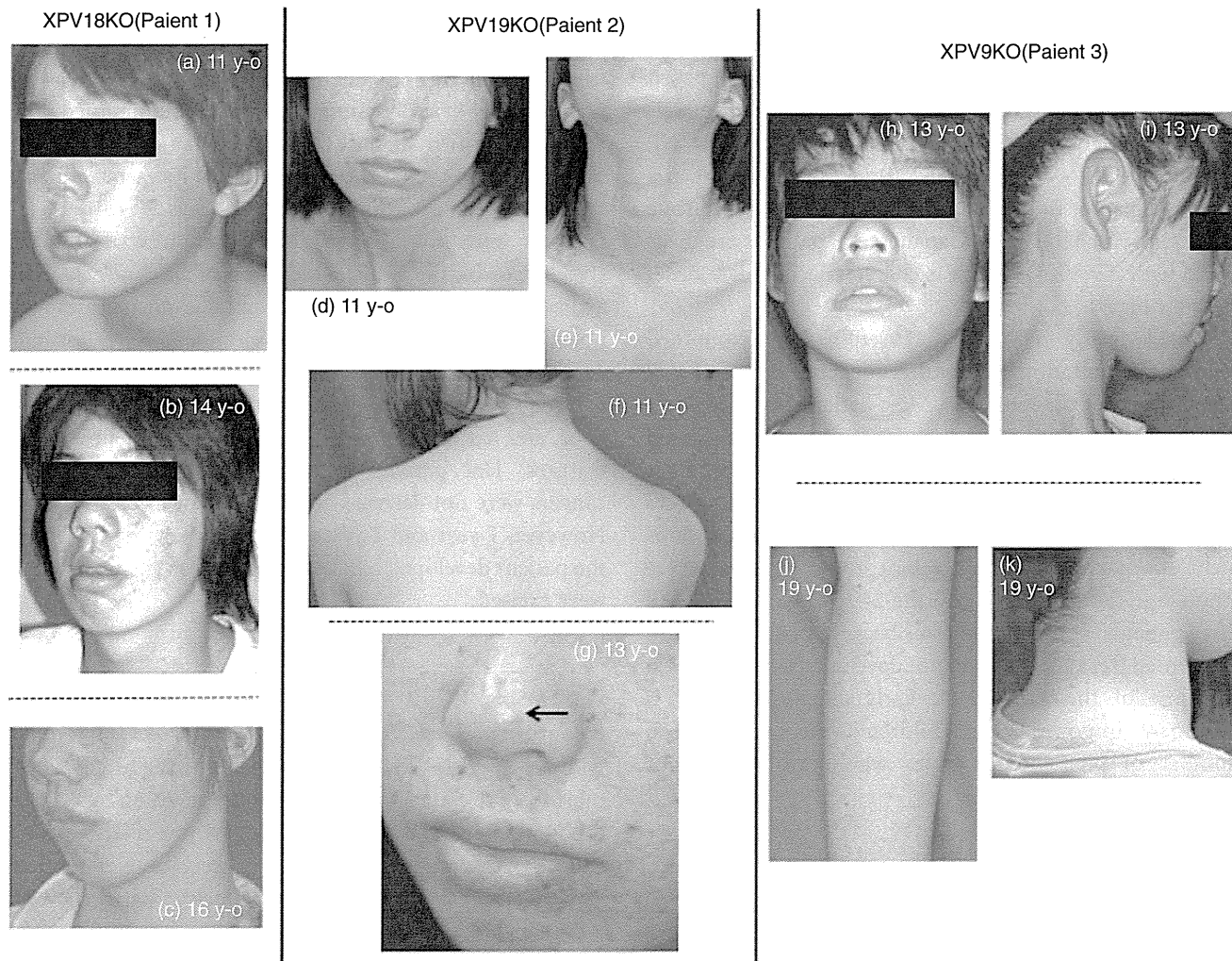


Fig. 1. Clinical features of Patient 1 (a, b, c), Patient 2 (d, e, f, g) and Patient 3 (h, i, j, k). Patient XPV18KO (Patient 1) at the age of 11 years (first visit to our hospital) (a), at 14 years of age (b) and at 16 years of age (c). His eyes did not appear red. Patient XPV19KO (Patient 2) at her first visit to our hospital (d, e, f): She had freckles on sun-exposed skin areas, including those regions of skin not covered by a bathing suit, such as her upper back and shoulders. Patient 2 developed basal cell carcinoma at the tip of the nose (g). Patient XPV9KO (Patient 3) displayed very subtle pigmented freckles on sun-exposed areas at her first visit at the age of 13 years (h, i), which increased in number over 1 year. After 14 years of age, she began to practice strict avoidance of sun exposure, which ensured that the extent of her pigmented freckles was limited (j, k). Her eyes did not appear red.

Co, Yokosuka, Japan) sunlamps, and the dose required to cause faint but discernible erythema was determined according to the standard photo-testing methodology (5).

Cell culture

Primary cultured fibroblasts were grown from skin biopsy specimens obtained from the patients. Normal fibroblasts were obtained from a healthy 26-year-old female volunteer

(6). All cell strains were maintained as previously described (6). Skin biopsies were performed after obtaining the written informed consent from the patients or their families.

UVC irradiation

Germicidal lamps emitting predominantly 254 nm light (Toshiba GL10, Toshiba Electric Co) were used as a source of UVC. Fluence rates were measured by UV radiometers

(UV-254, Topcon, Tokyo Kogaku Kikai KK, Tokyo, Japan), as previously described (6).

Post-UV colony formation assay in the presence or absence of caffeine

Cellular sensitivity to UVC was examined by measuring colony-forming ability after UVC irradiation, as previously described (6). Colony-forming ability after UVC irradiation in the absence of caffeine was compared with that in the presence of 1 mM of caffeine.

Semiquantitative detection of POLH protein

POLH levels were assessed using IP followed by Western blotting, as previously described (6).

Mutation analysis

Genomic DNA was extracted from primary fibroblasts using a standard method. Each exon (Exons 1 through 11) of *POLH* and the flanking sequence were amplified from genomic DNA as previously described (6).

Reverse transcription-PCR (RT-PCR) and direct sequencing of the PCR products

Total RNA was extracted from cultured fibroblasts using TRIzol reagent (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), following the protocol described by the supplier. One microgram of total RNA was reverse transcribed with SuperScript II (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in the presence of Oligo(dT)₁₂₋₁₈ primer. The cDNA was amplified using primers RT-E5F: 5'-TTGTGGAAGGAAATGAGAGCA-3' and RT-E8R: 5'-GTTGCCTGGGTTTAAC TGGA-3' encompassing exons 5 through 8, and primers RT-E8F: 5'-TCCAGTTAAACCCAGGCAAC-3' and RT-E11R: 5'-TGCTCAAGAAGCTGGTGATG-3' encompassing exons 8 through 11 of the *POLH* mRNA. The amplified products were purified and directly sequenced with RT-PCR primers.

RESULTS

Normal MED in all three patients

The MED for Patient 1, Patient 2 and Patient 3 were 100 mJ/cm², 150 mJ/cm² and 100 mJ/cm², respectively. None of the patients experienced prolonged erythema, indicating that the MED for all three patients was within the normal range. The MED range for healthy Japanese subjects at our institution is 60–140 mJ/cm².

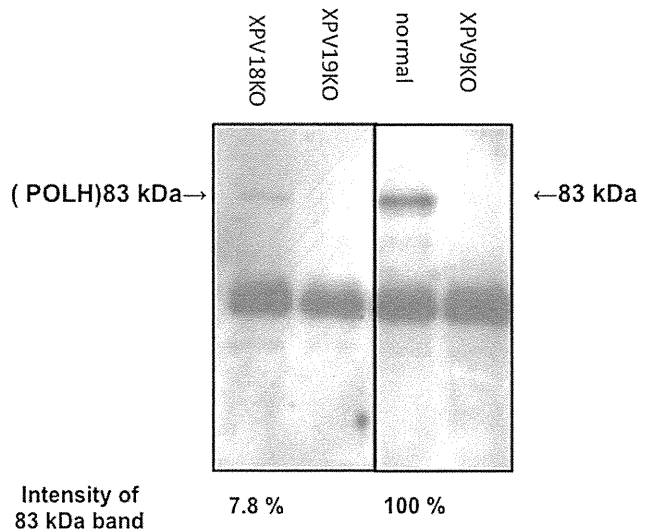


Fig. 2. Detection of POLH protein by immunoprecipitation for Patient XPV18KO. A very faint 83 kDa band was detected for Patient XPV18KO (lane a), whereas no band was detected for Patients XPV19KO (lane b) and XPV9KO (lane d). A strong 83 kDa band was detected in control cells (lane c).

Reduced POLH protein

Given the clinical features observed in these patients, XP-V or XP-E was suspected. First, the presence of the POLH protein was analyzed using IP. No POLH band was detected for XPV19KO (Patient 2) or XPV9KO (Patient 3). However, a very faint band for POLH was detected for XPV18KO (Patient 1). Semiquantification using densitometry indicated that the expression of POLH for XPV18KO was 7.8% of the normal expression level (Fig. 2).

Caffeine test

Because a small amount of POLH protein was detected for XPV18KO, a caffeine test was performed. Colony-forming ability was calculated as the plating efficiency at each dose relative to a plating efficiency of 100% in non-UV conditions. Each point represented the mean of four samples.

In the post-UV colony-forming assay, XPV18KO displayed normal sensitivity to UV without caffeine but hypersensitivity to UV in the presence of caffeine (Fig. 3). This was strongly suggestive of XPV18KO being a XP-V.

Genetic analysis

Direct sequencing of the genomic DNA of XPV18KO (Patient 1) revealed a heterozygous 26 bp deletion at the 5' splice site of intron 9 (Fig. 4a). To examine whether this

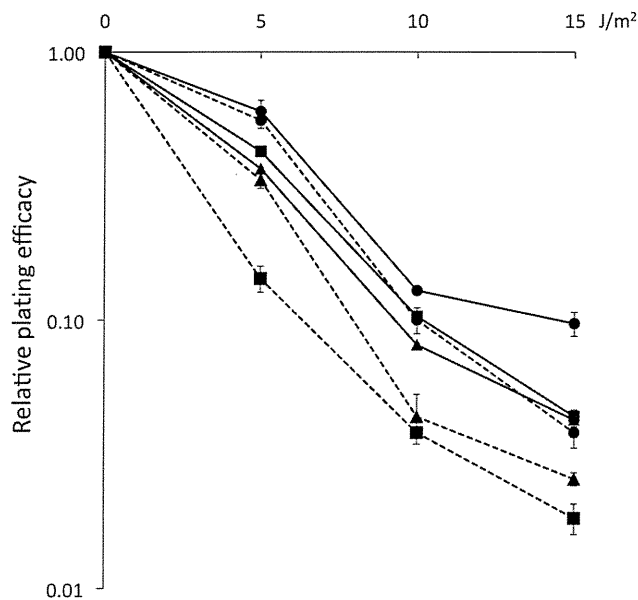


Fig. 3. Caffeine test. Post-UV sensitivity was assayed using colony formation with or without caffeine (1 mM) in the medium. Cells from Patients XPV18KO and XPV19KO were hypersensitive to UV in the presence of caffeine, whereas they showed almost normal sensitivity to UV in the absence of caffeine. Symbols indicate: \square Normal without caffeine; \blacksquare Normal with caffeine; \circ XPV19KO without caffeine; \bullet XPV19KO with caffeine; \triangle XPV18KO without caffeine; \blacktriangle XPV18KO with caffeine. Error bar indicates the standard error of the four samples.

deletion causes aberrant splicing, we examined the cDNA sequence of XPV18KO. RT-PCR of the mRNA isolated from XPV18KO using the RT-E8F and RT-E11R primers revealed two bands for XPV18KO, whereas only one band was amplified from a control subject (Fig. 4b). Bands A and B were excised from the gel and sequenced. The size of band A was 413 bp (also present in the control subject), and its sequence was identical to control *POLH* cDNA sequence. The size of band B was 347 bp, which was 66 bp shorter than the control sequence. This indicated skipping of exon 9 because of a 26 bp deletion at the 5' splice site of intron 9 [c.1246_1311del66 (del exon 9)]. Cells from XPV18KO possessed a heterozygous single nucleotide polymorphism (SNP; rs6941583 A > T) in exon 11 (data not shown). In addition, RT-PCR using the RT-E5F and RT-E8R primers revealed two bands (Fig. 4d); one was 357 bp (consistent with control size) and the other was 253 bp (104 bp shorter than control size). Direct sequencing of this smaller amplicon revealed that the entire exon 6 was excluded, causing a frameshift at codon 221 that results in premature termination at codon 223 [c.661_764 del104 (del exon 6)]. Genomic sequencing of DNA from the

patient's parents revealed that his father harbored the 26 bp deletion in intron 9 and SNP rs6941583 A > T, but his mother did not possess either of these mutations. We could not confirm whether his mother had an exon 6 deletion in her cDNA because we could not obtain her fibroblasts. XPV19KO (Patient 2) had the compound heterozygous mutations of G490T and C1066T (Supporting Information Fig. S1a).

DISCUSSION

We presented three cases of school-age children with XP-V that were diagnosed genetically before the development of skin cancer and presented 2–9 years of follow-up of the patients. One case (Patient 3) had already been diagnosed in a previous study, and the other two cases were diagnosed in the present study. We identified a mutation in XPV18KO that has not yet been reported. Although none of the three patients had developed skin cancer at the time of their first visit, the distribution of pigmented freckles, the large variation in the color and shape of pigmentation and the annual but not seasonal increase in the number of these freckles was strongly suggestive of the diagnosis of XP. The MED for all three patients was within the normal range, which was consistent with the lack of severe sunburn. Consequently, all three patients grew up without protection from sunlight. Furthermore, Patient 1 and Patient 2 spent long hours outdoors performing activities (soccer and swimming, respectively). This provides strong evidence to confirm that they had not experienced severe sunburn, as was asserted by both patients and parents. Slight freckling on sun-exposed areas is the only evidence for XP-V diagnosis in childhood before the development of typical clinical features, including prominent freckling, xerotic skin and skin cancers.

From the clinical features, we strongly suspected XP-V, which prompted us to detect *POLH* expression and perform genetic analysis of *POLH*. The *POLH* protein band for XPV18KO was of normal size, but its signal intensity was decreased relative to control levels. As we reported previously in our IP system for *POLH*, the 83 kD band is not detected in most XP-V cases, possibly because of the use of mouse monoclonal antibody (sc-17770) against *POLH*, which recognizes the C-terminal end of *POLH* (amino acids 412–712). A caffeine test showed that the post-UV cellular sensitivity of Patient XPV18KO increased by adding caffeine to the medium, suggesting that Patient XPV18KO has XP-V. If a faint band is detected by the *POLH* IP assay, the caffeine test is a useful method for XP-V diagnosis.

A novel mutation was discovered in Patient XPV18KO, namely a 26 bp deletion at the 5' splice site of intron 9

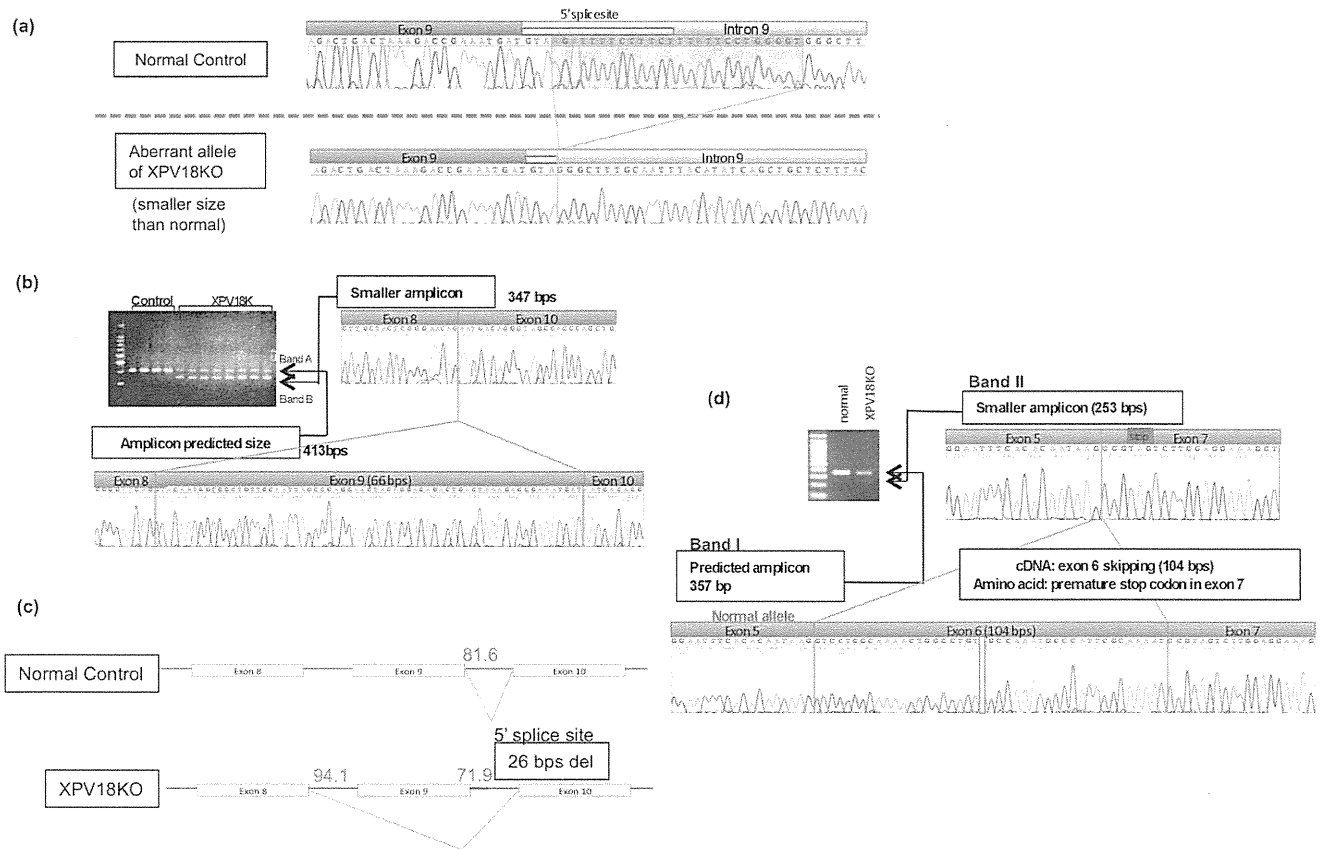


Fig. 4. Genomic and cDNA sequences of *POLH* for Patient XPV18KO. (a) Genomic DNA sequence of Patient XPV18KO reveals a heterozygous 26 bp deletion (AGATTTCTTTCTTTATTCCTGGGGGGT) at the 5' splice site of intron 9; (b) *POLH* cDNA reverse transcription-PCR (RT-PCR) (exons 8–11) for Patient XPV18KO revealed exon 9 skipping (66 bp) in 1 allele; (c) calculation of Shapiro's splicing probability indicated that intron 8 is a more accessible splice site than the mutated intron 9, resulting in exon 9 skipping; (d) RT-PCR of exons 5–8 revealed that Patient XPV18KO had a deletion of exon 6 in the heterozygous state.

(Fig. 4a), which caused aberrant splicing that resulted in the skipping of exon 9 (Fig. 4b). According to the splicing probability score (7), the mutated splice site in intron 9 would serve as a less accessible donor site than the splice donor site in intron 8 (Fig. 4c). This novel mutation was inherited from the patient's father. The other allele contained a complete deletion of exon 6, which was the same type of mutation reported in two German XP-V patients (8, 9). XPV19KO (Patient 2) harbored compound heterozygous mutations of G490T and C1066T (Supporting Information Fig. S1b), which were exactly the same compound heterozygous mutations as in Patient XPV2TK in our previous study. The former mutation is one of the four founder mutations in Japanese patients with XP-V (5), and the latter mutation is found in both Japanese and European patients with XP-V. Patient 3 had a homozygous single nucleotide deletion (5) that caused a premature termination at codon 584 outside the catalytic domain (Supporting Information Fig. S1b).

The predicted *POLH* protein sequences of the three patients are summarized in Fig. 5. Kraemer reported that in Patient XP3GO, a homozygous deletion of exon 6 was absent for the *POLH* IP band, which implies that the faint band present in Patient XPV18KO may be caused by exon 9 skipping because the predicted protein of this mutated allele possesses 691 amino acids, missing only 22 amino acids in the heterozygous state, and it contains the antigen recognition sites for the monoclonal antibody (sc-17770) against *POLH*.

Though all of the patients were referred to us as school-age children because of an increase in pigmented freckles, their clinical features were very different. Patient 2 developed pigmented freckles at 2 years of age, and her freckle-like pigmentation was already prominent at the age of 11; she developed BCCs at the ages of 12 and 13. In contrast, pigmented freckles were noticed at 4–6 years of age in Patients 1 and 3. Their pigmented freckles were subtle at their first visit, and they had not developed skin cancer by

Predicted POLH protein

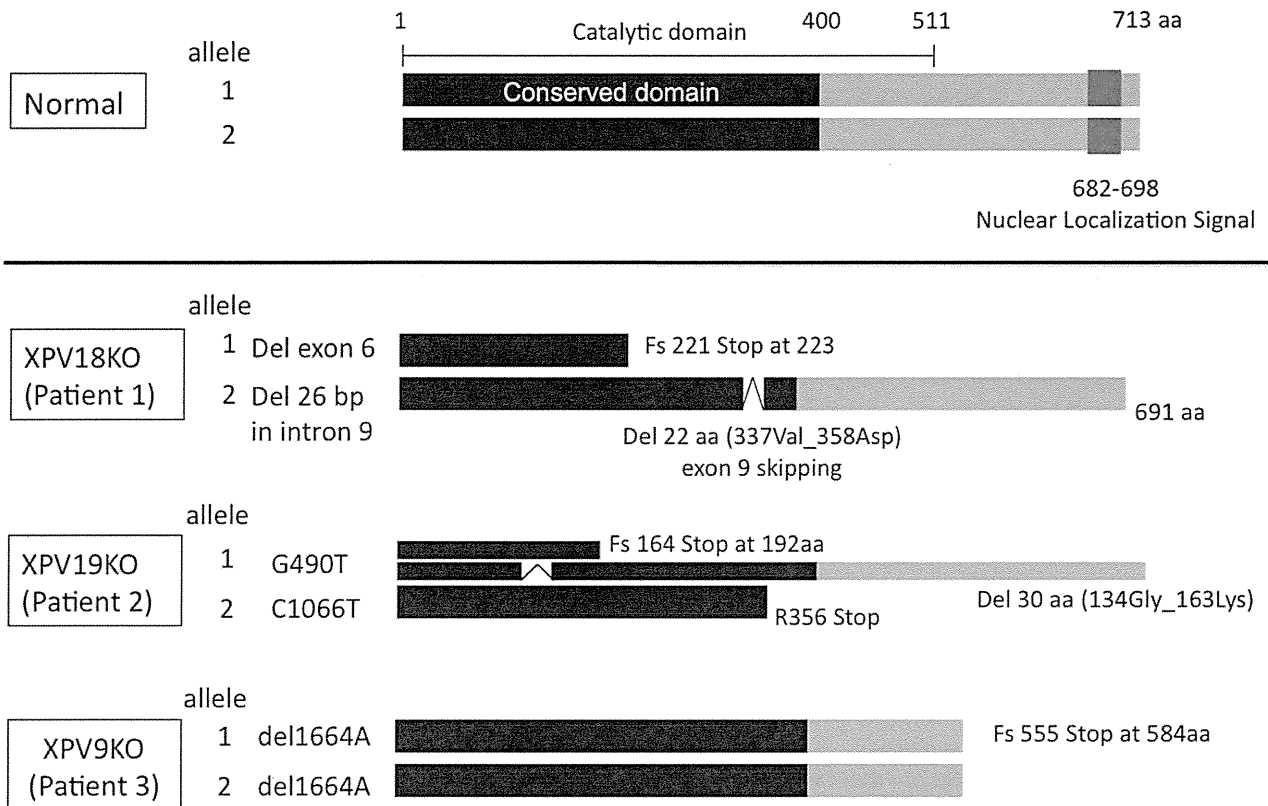


Fig. 5. Predicted POLH protein sequence for each patient.

the ages of 16 and 21, respectively. This difference may be because of the greater cumulative extent of sun exposure for Patient 2 before diagnosis.

XP-V patients rarely experience sunburn. Nonetheless, they develop pigmented freckles that are limited to sun-exposed skin areas. A longer duration is required for school-age children to accept their disease. Patient 1 did not make any effort to avoid sun exposure before a genetic diagnosis was made; this led to a great increase in the number of pigmented freckles over 3 years (Fig. 1b). It is difficult to convince the 16-year-old boy to apply sunscreen although he is conscious of his disease (Fig. 1c). Patient 3 began practicing strict sun protection 1 year after the genetic diagnosis, which prevented an increase in freckle-like pigmentation and the development of skin cancer by the age of 21 (Fig. 1j, k). The early diagnosis of XP-V for school-age children is extremely important because they often spend time outdoors.

ACKNOWLEDGEMENT

We gratefully thank Dr Ken Kraemer for his critical reading of the manuscript and valuable suggestions.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site:

Fig. S1. Genomic sequence analysis of *POLH* for Patient 2 (XPV19KO) and Patient 3 (XPV9KO). (a) Genomic DNA sequence for Patient XPV19KO revealed compound heterozygous mutations in *POLH*: G490T at the 3' end of exon 4 and C1066T in exon 9. Both mutations are previously reported founder mutations in Japanese patients with XP-V. (b) Patient XPV9KO had del1661A in exon 11 in a homozygous state.

REFERENCES

1. Masutani C, Kusumoto R, Yamada A *et al.* The XPV (xeroderma pigmentosum variant) gene encodes human DNA polymerase η . *Nature* 1999; **399**: 700–704.
2. Broughton BC, Cordonnier A, Kleijer WJ *et al.* Molecular analysis of mutations in DNA polymerase η in xeroderma pigmentosum-variant patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; **99**: 815–820.
3. Hirai Y, Kodama Y, Moriwaki S *et al.* Heterozygous individuals bearing a founder mutation in the XPA DNA repair gene comprise nearly 1% of the Japanese population. *Mutat Res* 2006; **601**: 171–178.
4. Kleijer WJ, Laugel V, Berneburg M *et al.* Incidence of DNA repair deficiency disorders in western Europe: xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy. *DNA Repair (Amst)* 2008; **7**: 744–750.
5. Masaki T, Ono R, Tanioka M *et al.* Four types of possible founder mutations are responsible for 87% of Japanese patients with Xeroderma pigmentosum variant type. *J Dermatol Sci* 2008; **52**: 144–148.
6. Tanioka M, Masaki T, Ono R *et al.* Molecular analysis of DNA polymerase η gene in Japanese patients diagnosed as xeroderma pigmentosum variant type. *J Invest Dermatol* 2007; **127**: 1745–1751.
7. Shapiro MB, Senapathy P. RNA splice junctions of different classes of eukaryotes: sequence statistics and functional implications in gene expression. *Nucleic Acids Res* 1987; **15**: 7155–7174.
8. Gratchev A, Strein P, Utikal J, Sergij G. Molecular genetics of xeroderma pigmentosum variant. *Exp Dermatol* 2003; **12**: 529–536.
9. Inui H, Oh KS, Nadem C *et al.* Xeroderma pigmentosum-variant patients from America, Europe, and Asia. *J Invest Dermatol* 2008; **128**: 2055–2068.